



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C07K 14/51, C12N 15/12, A61K 38/17, C12P 21/02		A1	(11) 国際公開番号 WO96/33215
			(43) 国際公開日 1996年10月24日(24.10.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01062 (22) 国際出願日 1996年4月19日(19.04.96)		佐藤右典(SATOH, Yusuke)[JP/JP] 〒350-11 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキストジャパン株式会社 医薬研究開発本部内 Saitama, (JP) (74) 代理人 弁理士 高木千嘉, 外(TAKAGI, Chiyo et al.) 〒102 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル Tokyo, (JP)	
(30) 優先権データ 特願平7/93664 1995年4月19日(19.04.95) JP 特願平7/322403 1995年11月17日(17.11.95) JP		(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ヘキストジャパン株式会社 (HOECHST JAPAN LIMITED)[JP/JP] 〒107 東京都港区赤坂8丁目10番16号 Tokyo, (JP)	
(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 牧島房夫(MAKISHIMA, Fusao)[JP/JP] 高松宏行(TAKAMATSU, Hiroyuki)[JP/JP] 三木秀夫(MIKI, Hideo)[JP/JP] 河合伸治(KAWAI, Shinji)[JP/JP] 木村道夫(KIMURA, Michio)[JP/JP] 松本智明(MATSUMOTO, Tomoaki)[JP/JP] 勝浦美枝子(KATSUURA, Mieko)[JP/JP] 榎本耕一(ENOMOTO, Koichi)[JP/JP]		(81) 指定国 AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IS, JP, KG, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, ARIPO特許(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ヨーラシア特許(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 歐州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
		添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title : NOVEL PROTEIN AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称 新規なタンパク質およびその製法

(57) Abstract

A protein comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 in the Sequence Listing and originating in human MP52 and the dimer of this protein. This dimer protein can be obtained by constructing a plasmid containing a DNA wherein a codon encoding methionine is added to the 5' end of a DNA sequence encoding the above-mentioned aminoacid sequence, transforming *Escherichia coli* by this plasmid, incubating the *E. coli* transformant, solubilizing and purifying the obtained inclusion body to thereby give a monomer protein, and then renaturing the obtained monomer protein into the dimer followed by purification. This dimer protein is useful in the treatment of cartilage and bone diseases.

(57) 要約

ヒトMP52由来の配列表配列番号1記載のアミノ酸配列からなるタンパク質および該タンパク質の二量体。上記アミノ酸配列をコードするDNA配列の5プライム末端にメチオニンをコードするコドンを付加したDNAを含有するプラスミドを構築し、そのプラスミドで大腸菌を形質転換し、その大腸菌を培養することによって得られるインクルージョンボディを可溶化し、精製することによって得られる単量体のタンパク質を二量体に再生し、これを精製することにより上記二量体タンパク質が得られる。この二量体タンパク質は、軟骨、骨疾患の治療に有用である。

情報としての用途のみ
PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LL	スリランカ	ROU	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	スリベリア	RUS	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SDE	スードン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SEG	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LUV	ルクセンブルグ	SIK	シンガポール
BEE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SSN	スロヴェニア
BFG	ブルガリア・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SSZ	スロヴァキア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドバ共和国	SIK	セネガル
BJR	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZD	スウェーデン
BYA	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TDC	チャド
CA	ベラルーシ	IE	アイルランド	VI	ヴィエトナム共和国	TG	トーゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CG	コング	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CH	スイス	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CII	コート・ジボアール	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NE	ニジエール	UG	ウガンダ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CU	キューバ	KR	大韓民国	NO	オーランウエー	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	VN	ヴィエトナム

明 細 奏

新規なタンパク質およびその製法

技術分野

本発明は、MP52由来の配列表配列番号1のアミノ酸配列を有するタン
5 パク質に関する。また、本発明は前記タンパク質の二量体およびこの二
量体タンパク質からなる軟骨、骨疾患治療剤に関する。また、本発明は
上記タンパク質を発現しうるDNA配列を含むプラスミドで形質転換した
10 大腸菌を用いて上記タンパク質を大量かつ高純度で製造する方法に関する。
さらに本発明は上記二量体タンパク質を投与することからなる軟骨、
15 骨疾患の治療方法に関する。

背景技術

現在、骨疾患の予防ないしは治療剤としては、エストロゲン、カルシ
トニン、ビタミンD3とその誘導体およびビスホスホン酸誘導体などが
知られている。また最近になってTGF- β ジーンスーパーファミリーに
15 属する骨誘導因子(Bone morphogenetic protein: 以降BMPと呼ぶ)である
BMP-2からBMP-9等の一連のタンパク質に骨誘導の作用のあることが報
告されている。

さらにMP52と称されるタンパク質 (WO 93/16099およびWO 95/04819)
に骨誘導の作用があることが報告されている。成熟型MP52はN末端にア
20 ラニンを有する120残基からなるタンパク質であると考えられており、
そのアミノ酸配列はこれらの特許に記載されている。

またMP52とよく似たアミノ酸配列を有するGDF-5と称されるマウス由
来の蛋白質についてはNature, vol. 368, p. 639-643 (1994年) および
25 WO 94/15949に記載されている。

しかしながら、これらのタンパク質を工業的な規模で純粋な形で製造
することは容易ではない。

MP52を遺伝子工学的に製造するに当たってL-細胞のような動物細胞

を使うことが試みられた。しかし純粹なMP52を収率よく製造することは容易ではない。

発明の開示

本発明者らは、MP52を大腸菌を使って遺伝子工学的手法により大量に5 製造することを試みた。すなわちアラニンから始まるMP52をコードするDNAの5プライム末端にメチオニンをコードするコドンを付加して大腸菌によってMP52を製造することを試みた。その結果生産されるものはMP52のみならずN末端にメチオニンを有する121残基のタンパク質、およびN末端のアラニンが脱落してプロリンから始まる119残基のタンパク質が生成しこの混合物からMP52を純粹に分離することは極めて困難であった。

本発明者は、MP52のN末端のアラニンを削除した119残基よりなる配列表配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNA配列の5プライム末端にメチオニンをコードするコドンを結合させたプラスミドを構築し、このプラスミドを導入した大腸菌を用いて発現させたところ、N末端がプロリンから始まる配列表配列番号1記載のタンパク質を選択的に極めて収率よく生産することを見い出した。

しかも配列表配列番号1に記載したタンパク質の二量体は軟骨・骨誘導活性を有することを確認し、本発明を完成した。

本発明は、配列表配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に関する。このタンパク質は120残基からなる成熟型部分と見なされているヒトMP52よりN末端のアラニンを削除した119残基のアミノ酸からなるタンパク質である。本発明により得られるタンパク質は水溶液に可溶性である。さらに本発明のタンパク質はヒト由来であることを特徴とするため、それ自身の毒性は少ない。

また本発明は、配列表配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質の二量体からなる軟骨および（または）骨疾患の治療剤に関する

る。より詳細には、本発明のタンパク質の二量体は軟骨・骨誘導活性を有するため、骨粗鬆症、先天性軟骨・骨疾患、変形性膝関節症・変形性股関節症等の変形性関節症または、骨関節炎、半月損傷等の軟骨損傷、外傷・腫瘍摘出等による骨・軟骨欠損部の再生、骨・軟骨欠損、骨折、

5 軟骨形成不全症・軟骨発育不全症・軟骨無形成症・口蓋裂・骨形成不全症等の先天性軟骨・骨疾患、さらには、歯根・歯槽の欠損等の予防および治療剤に関する。さらに本発明のタンパク質は軟骨・骨誘導活性を有するため美容外科の骨移植の治療等に用いることが出来る。これらの治療には、獣医外科領域のものも含まれる。

10 本発明は、配列表配列番号1で示されるヒトMP52由来の119残基のアミノ酸からなるタンパク質を大腸菌を用いて製造する方法に関する。さらに、本発明は配列表配列番号1で示されるヒトMP52由来の119残基のアミノ酸配列をコードするDNA配列の5プライム末端にメチオニンをコードするDNAを含有するプラスミドの構築に関する。ヒトMP52cDNA

15 は、WO 93/16099記載のcDNAを含んだプラスミドベクターを鋳型DNAとして、成熟型部分のみをポリメラーゼ連鎖反応(PCR法)を用いて増幅した。ここで用いるPCR法とは通常核酸DNAまたはRNAの微量断片を米国特許番号4,683,195に記載されている方法で増幅することを意味する。

本発明のタンパク質を生産するために、このタンパク質をコードして

20 いるDNAを含んだ適切な発現ベクターを構築し、遺伝子工学の手法により好ましい大腸菌の宿主に導入する事が必要である。本発明のタンパク質を大量に生産するため以下の2つの改良方法を施した。1)目的蛋白質の生産性を上げる方法: M. Nobuharaらが報告 (Agric. Biol. Chem., 52(6), 1331~1338, 1988)している翻訳効率を上げる方法、即ち、開始

25 コドンATG周辺のAT含量を上げる方法、および2)プラスミドの複製数を上げる方法、即ち複製オリジンをpBR系からpUC系に変更する方法。さらにプロモーター領域と配列表配列番号1のアミノ酸配列をコードする

DNA配列とを直接つなぐことにより本発明の発現ベクター(pKOT245)を構築した。このベクターは通商産業省、工業技術院国立生命科学・人間技術研究所(NIBH)(茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1-3(日本)に1995年4月14日付で受託番号FERM P-14895号として寄託され、1996年4月10

5 日付でブタペスト条約に基づく寄託へ移管された(FERM BP-5499)。

本発明は、配列表配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列の5プライム末端にメチオニンをコードするコドンを付加したDNAを含有するプラスミドを構築し、そのプラスミドで大腸菌を形質転換し、その大腸菌を培養することによって得られるインクルージョンボディを可溶化し、精製することによって得られる単量体のタンパク質、およびこれを再生、精製することによって得られる配列表配列番号1のタンパク質の二量体のタンパク質の製造方法に関する。すなわち、本発明のタンパク質は大腸菌インクルージョンボディを可溶化した後、SP-Sepharose FFカラムおよびSephadryl S-200カラムにより単一なスルホン化MP52単量体を得た。それからリフォールディングを行った後等電点沈殿し、逆相HPLCのRESOURCE RPCカラムを通すことにより本タンパク質の精製二量体画分を得た。得られた本タンパク質の物理化学的性質はN末端アミノ酸配列、アミノ酸組成および電気泳動による分析で解析した。

20 本発明は、さらに本発明の発現ベクターを組み込んだ大腸菌の培養を培養液の温度28°C~34°C、pH 6~8、溶存酸素濃度20~50%の条件下で行う製造方法に関する。

本発明のタンパク質の二量体の生物学的活性は異所性軟骨・骨形成(エクトピックボーンフォーメーション)の軟X線写真撮影解析、組織学的解析および経時的解析により評価した。さらに、膜内骨化に対する作用、関節軟骨の再生に対する効果および骨折・骨欠損に対する治癒効果により、本発明のタンパク質が軟骨・骨再建に有効であることを確認

した。

全身投与方法としては静脈内、筋肉内および腹腔内投与が可能であり、静脈内投与の場合は通常の静脈内注射の他点滴静注が可能である。

注射用製剤としては、例えば注射用粉末製剤とすることができます。その場合は適当な水溶性賦形剤、例えばマンニトール、ショ糖、乳糖、マルトース、ブドウ糖、フルクトース等の一種または2種以上を加えて水で溶解し、バイアルまたはアンプルに分注した後、凍結乾燥し密封して製剤とすることができます。

局所投与方法としては、その部位の軟骨・骨あるいは歯の表面をコラーゲンペースト、フィブリンのりまたは他の接着剤を用いて本タンパク質で覆う方法がある。これらのうち骨移植に用いる骨は天然骨の他、従来用いられる人工骨にも利用できる。人工骨とは金属、セラミックス、ガラス等の天然素材または人工無機質素材で出来た骨を意味する。人工無機質素材として好ましくはハイドロキシアパタイトがあげられる。例えば、人工骨の内部材料に金属そしてその外側の材料にハイドロキシアパタイトを使用する。さらに、本タンパク質は骨再構築を促進するため癌性骨組織にも投与出来、また、軟骨移植にも利用可能である。

投与量については、本タンパク質の作用に影響する様々な要因、たとえば、形成が望まれる骨・軟骨の重量、骨・軟骨損傷の部位およびその状態、患者の年齢、性別、感染の重症度、投与時間および他の臨床要因を考慮して担当医が決定する。また、用量は本タンパク質との再構成に用いる担体の種類によって変動し得る。一般的に、投与量は、支持体との組成物として使用するとき、所望の骨・軟骨湿重量当たり、本タンパク質約 $10\sim10^6$ ナノグラム、注射剤として局所および全身性に適用するとき、患者1人当たり $0.1\sim10^4$ マイクログラムを一週間に一度から一日に一度の頻度で投与することが好ましい。

骨・軟骨再生に対して既知の成長因子例えばinsulin-like growth

factor-I (IGF-I) 等を同時適用することにより相乗効果が期待できる。

5 このように本発明のタンパク質を工業的な規模でしかも純粋な形で製造する方法は今まで報告されておらず、軟骨・骨誘導活性を有する軟骨、骨疾患治療剤として有効である。さらに本発明の製造方法は今まで動物細胞でのみしか産生できなかったTGF- β ジーンスーパーファミリーに属する前述の骨誘導因子の製造にも応用できる。

図面の簡単な説明

10 図1は、実施例1(2)で得られた本発明のタンパク質の発現ベクター (pKOT245) のプラスミドマップである。

図2は、実施例4(1)で得られたマウス大腿筋内に誘導された骨・軟骨石灰化組織の軟X線写真である。

図3は、実施例4(1)で得られたマウス大腿筋内に誘導された骨・軟骨石灰化組織の非脱灰切片の組織染色顕微鏡写真である。

15 図4は、実施例4(2)で得られたマウス大腿筋内において観察された軟骨・骨誘導の経時的变化を示す組織染色顕微鏡写真である。

図5は、実施例4(3)で得られたラット頭頂骨の脱灰切片の組織染色顕微鏡写真である。

20 図6は、実施例4(4)で得られた家兔の関節軟骨を含む大腿骨頭部の脱灰組織切片の組織染色顕微鏡写真である。

図7は、実施例4(5)で得られた大腿骨に骨欠損が作成されたラットの大腿部の軟X線写真である。

発明を実施するための最良の形態

25 次に、実施例を示して本発明の効果を具体的に説明する。なお、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

実施例1 ベクターの作製

(1) 変異型MP52成熟型部分の単離

ヒトMP52cDNAは、WO 93/16099に記載されたcDNAを含んだプラスミドベクター(pSK52s)を鑄型DNAとして、成熟型部分のみをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて増幅した。

開始コドンATG周辺のAT含量を上げる事により、目的タンパク質の生産性を上げる方法(M. Nobuharaらの報告(Agric. Biol. Chem., 52(6), 1331~1338, 1988))に従い成熟型のMP52遺伝子の一部のDNAを置換した。

置換の方法は、配列番号2の順方向PCRプライマーを用い、PCR法で行った。PCRプライマーのDNA配列は、順方向プライマーとして配列番号2、10 および逆方向プライマーとして配列番号3記載のDNAを用いた。

PCRは、同じ試験管中で、鑄型DNA(10ナノグラム)、順方向および逆方向PCRプライマー各々50ピコモル、dNTP(0.2ミリモル)、およびMgCl₂(1.5ミリモル)をTaq DNAポリメラーゼ(5U)と共に加えることにより行った。

15 各サイクルが、変性(94°C、1分間)、プライマーアニーリング(55°C、1分間)、およびプライマー伸長(72°C、2分間)からなる30サイクルのPCRを行った(以下のPCRはすべてこの条件で行った)。

PCR反応からの生成物を1.5%低融点アガロース(FMC社)中で電気泳動により分離し、配列番号1のアミノ酸配列に相当する約360bpからなるDNAを切り出した(これをフラグメント1とする)。

(2) 本タンパク質の大腸菌発現ベクターの構築

プラスミドの複製数を上げるために、複製オリジンをpBR系からpUC系に改変した。市販の大腸菌発現ベクターpKK223-3(ファルマシア・バイオテク株式会社より購入)のtacプロモーター領域を制限酵素SspIとEcoRIで消化後、Mung Bean Nuclease(宝酒造株式会社、カタログ番号2420A)で処理し、フラグメント1の開始コドン側にT4DNA Ligase(宝酒造株式会社、カタログ番号2011A)で結合させ、pKK223-3のrrnBT₁T₂ベクター

ミネーター領域を制限酵素SalIとSspIで消化し、SalIで消化したフラグメント1の終止コドン側に結合させ、pUC18のSmaI部位に組み込むことにより、本タンパク質の生産のための発現ベクター(pKOT245(受託番号微工研寄第P-14895号)) (図1)を構築した。pKOT245のDNAの長さは3.7
5 kbである。作製した本発明のタンパク質発現ベクターは、Pharmacia ALF DNA シークエンサーによりその塩基配列の決定を行った。

(3) 形質転換

形質転換は、Kushnerらの塩化ルビジウム法 (Genetic Engineering, p. 17, Elsevier (1978)) に従った。即ち、pKOT245を宿主大腸菌W3110M
10 へ上記の手法に従い移入し、本発明のタンパク質生産大腸菌とした。

実施例2 培養

(1) 培養

本発明のタンパク質発現大腸菌を改変SOC培地 (Bacto tryptone 20g/l, Bacto yeast extract 5g/l, NaCl 0.5g/l, MgCl₂·6H₂O 2.03g/l, Glucose 3.6g/l) で前培養し、生産用培地 (Bacto tryptone 5g/l, Citric acid 4.3g/l, K₂HPO₄ 4.675g/l, KH₂PO₄ 1.275g/l, NaCl 0.865g/l, FeSO₄·7H₂O 100mg/l, CuSO₄·5H₂O 1mg/l, MnSO₄·nH₂O 0.5mg/l, CaCl₂·2H₂O 2mg/l, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.225mg/l, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.1mg/l, ZnSO₄·7H₂O 2.25mg/l, CoCl₂·6H₂O 6mg/l, MgSO₄·7H₂O 2.2g/l, Thiamine HCl 5.0mg/l, Glucose 3g/l) 5Lに対し菌体懸濁液を100ml添加し、10Lの培養槽で通気攪拌しながら培養し、対数増殖前期 (OD550=5.0) に達した段階で1mMの濃度でイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを添加し、さらにOD550が150に達するまで培養した。培養中、温度は32°C、pHはアンモニアを添加することにより7.15に制御し、溶存酸素濃度の低下を防ぐために攪拌速度をあげることにより空気飽和の50%に溶存酸素濃度を制御した。また、高菌体濃度とするために溶存酸素濃

度の急激な上昇を指標として、50%グルコース溶液を0.2%濃度で添加しながら培養した。

(2) 大腸菌インクルージョンボディの調製

上記方法により得られた培養液を遠心して菌体を回収し、10mMエチレンチアミン四酢酸を含む25mM Tris-HCl緩衝液（pH7.3）に懸濁し菌体破碎装置（ゴーリン社製）を用いて細菌を破碎し、再度遠心してインクルージョンボディを含む沈殿を回収した。

実施例3 精製

(1) 大腸菌インクルージョンボディの可溶化

大腸菌インクルージョンボディを1% Triton X-100で3回洗浄後、3000×gで30分間、4℃で遠心し、得られた沈殿を20mM Tris-HCl緩衝液、pH8.3、8M尿素、10mM DTT、1mM EDTAで超音波をかけながら可溶化した。

(2) 単量体精製

その可溶化液を20000×gで30分間、4℃で遠心し、その上清を回収した。得られた上清を20mM Tris-HCl緩衝液pH8.3、6M尿素、1mM EDTAで平衡化したSP-Sepharose FF（ファルマシア社）に通し、同溶液で洗浄後、0.5M食塩を含む同溶液で溶出させた。溶出液にNa₂SO₃とNa₂S₄O₆をそれぞれ最終濃度が111mM、13mMになるように加え4℃、15時間スルホン化を行った。スルホン化溶液を20mM Tris-HCl緩衝液、pH8.3、6M尿素、0.2M食塩、1mM EDTAで平衡化したSephacryl S-200 HR（ファルマシア社）でゲルfiltrationを行い、单一なスルホン化された本発明のタンパク質単量体を得た。

(3) リフォールディング

スルホン化された本発明のタンパク質単量体の溶液に9倍量の50mM Na-Glycine緩衝液pH9.8、0.2M塩化ナトリウム、16mM CHAPS、5mM EDTA、2mM GSH（還元型グルタチオン）、1mM GSSG（酸化型グルタチオン）

を加えた後、1日間、4°Cで攪拌しリフォールディングを行った。

(4) 二量体精製

リフォールディングされた試料を純水で2倍希釈し、6N塩酸を加えpHを約7.4に合わせて等電点沈殿を行った。沈殿を3000×g、20分の遠心で集めた後、30%アセトニトリル、0.1%TFAに溶解した。その溶液を純水で2倍希釈し、0.05%TFA、25%アセトニトリルで平衡化しておいた逆相HPLCのRESOURCE RPCカラム(ファルマシア社)に通し、0.05%TFA、25~45%アセトニトリルグラジェントにより溶出した。溶出液は吸光度光度計を用い280nmの吸光度によりモニターし、精製された本発明のタンパク質二量体画分を得た。これを、スピードバックコンセントレーター(サーバント社)により凍結乾燥した。

(5) 精製された本発明のタンパク質の物理化学的性質の測定

(ア) N末端アミノ酸配列分析

上記で得られた精製された本発明のタンパク質につき、N末端アミノ酸配列をアミノ酸シークエンサー、モデル476A(アプライドバイオシステムズ社)により分析したところ、配列表配列番号1で示すN末端から30番目までのアミノ酸配列が確認された。

(イ) アミノ酸組成分析

上記で得られた精製された本発明のタンパク質のアミノ酸組成をアミノ酸分析機[PICO TAGシステム(ウォーターズ社)]により調べた。その結果を表1に示す。表に示された数は1モノマー当たりのアミノ酸残基数を示す。

表 1

アミノ酸	実測値	期待値
Asx	11.5	12
Glx	10.9	11
Ser	8.4	9
Gly	4.3	4
His	4.0	4
Arg	7.7	7
Thr	5.4	6
Ala	7.3	7
Pro	10.2	10
Tyr	2.9	3
Val	5.7	7
Met	5.1	4
^{1/2} Cys	2.6	7
Ile	4.9	6
Leu	10.0	10
Phe	4.0	4
Lys	5.9	6
Trp	—	2
配列の長さ		119

—: 検出不可能

(ウ) 電気泳動による分析

上記で得られた精製された本発明のタンパク質の分子量を非還元条件
20 下のSDS-PAGEにより確認したところ、約28KDaの分子量を示した。

上記(ア)、(イ)および(ウ)に示された結果より、本発明のタンパク質
はN末端が単一にProから始まる119残基からなるタンパク質であること
が解った。

実施例4 生物学的活性の測定

25 (1) 異所性軟骨・骨組織の誘導作用

実施例3により得られたタンパク質約500 μ gを10mM塩酸50 μ lに溶解、
同溶媒で希釈し、1 μ g/10 μ l、10 μ g/10 μ l、および100 μ g/10 μ l

の濃度の溶液を調製し、その $10\mu\ell$ を豚腱由来type-I コラーゲン溶液 $150\mu\ell$ (高研、0.5%、pH 3、I-AC)と混和し、中和した後、凍結乾燥し、得られた混和物を8週令の雄性ICRマウスの大腿筋内に埋め込み、21日後に大腿部を摘出し、皮膚を剥離した後、軟X線写真撮影により、骨・軟骨石灰化組織の発現率を検討した。表2にその結果を示す。 $1\mu\text{g}/$ 部位以上の用量においてその発現を認め、 $10\mu\text{g}/$ 部位以上の用量において用いられたマウス全例にその発現を認めた。

表 2

MP 52タンパク質の用量	*骨・軟骨石灰化組織の発現率
対照(type-I コラーゲン単独)	0/4
$1\mu\text{g}/$ 部位	3/4
$10\mu\text{g}/$ 部位	4/4
$100\mu\text{g}/$ 部位	4/4

*各群4例における実験の骨・軟骨石灰化組織の軟X線写真撮影解析による発現率を示す。

また、図2に各用量における典型的な骨・軟骨石灰化組織の軟X線写真像を示す。図2において、AはMP52タンパク質 $1\mu\text{g}/$ 部位、BはMP52タンパク質 $10\mu\text{g}/$ 部位、CはMPタンパク質 $100\mu\text{g}/$ 部位の用量でそれぞれMP52タンパク質をマウス大腿筋肉に埋め込んだ例の結果を示す。この結果より、用量依存的な骨・軟骨石灰化組織の増加が認められた。さらにこれらマウスの大腿部を、固定後、非脱灰切片を作成し、フォンコッサ(von Kossa)染色、アルシアンブルー(Alcian blue)染色、およびヘマトキシリントエオシン(Hematoxylin-eosin)染色をそれぞれ実施した。

図3に、本タンパク質 $10\mu\text{g}/$ 部位の用量においてtype-I コラーゲンとともに埋め込まれた標本の組織染色の顕微鏡写真を示す。図3において

て、Aはフォンコッサ染色、Bはアルシアンブルー染色、Cはヘマトキシリニーエオシン染色をそれぞれ示す。

図3(A)において、矢印ctの部分は石灰化組織を示し、矢印ccの部分は石灰化軟骨細胞を示す。図3(B)において、矢印rcの部分は残存軟骨組織を示す。図3(C)において、矢印ad部分は脂肪細胞、矢印bm部分は骨髓細胞、矢印1b部分は層板骨、矢印ob部分は骨芽細胞、矢印wb部分は線維性骨をそれぞれ示す。図3から、MP52タンパク質の投与により、骨芽細胞、骨髓細胞、石灰化軟骨細胞が生成し、骨・軟骨石灰化組織が形成されることが明らかである。

10 実施例4の結果から、本発明のタンパク質の二量体は、軟骨・骨誘導作用を有することが明らかとなった。

(2) 異所性骨化作用の経時的解析

実施例3により得られたタンパク質約3μgを含有する実施例4(1)に記載された方法と同様に調製した凍結乾燥物をICRマウスの大腿筋中に埋め込み、3、7、10、14、21および28日後に組織を摘出、10%ホルマリンで固定後、それらの組織切片にヘマトキシリニーエオシン染色(HE)およびフォンコッサ染色(von Kossa)を施した。図4にその染色切片の光学顕微鏡写真像を示す。

3日目(図4A、HE)において、埋め込まれたコラーゲン線維(co)と周囲の筋組織(m)との間に、形態学的には結合織性細胞を含む未分化間葉系細胞(mc)の出現が認められた。7日目(図4B、HE)から10日目(図4C、HE)にかけて、この部位には未分化間葉系細胞(mc)が集積・増殖し、未分化間葉系細胞の肥大化および前軟骨様組織への変化が認められた。14日目(図4D、HE;図4E、von Kossa)において、石灰化軟骨組織(矢印cc)および骨組織(矢印b)の形成を認めた。21日目(図4F、HE;図4G、von Kossa)において、骨髓細胞(矢印bm)の形成が見られる一方、14日目に観察された石灰化軟骨組織はほとんど認

められず、石灰化軟骨組織が骨組織（矢印 b）に変換されたものと考えられた。28日目（図 4 H、HE）において、広範囲に骨髄細胞（bm）が認められ、形成された骨組織（b）は、吸収過程にあるようであった。

このように、rMP52は、従来BMPsについて明らかにされているように
5 異所性に軟骨組織を誘導し、引き続き、軟骨内骨形成を引き起こすことができるタンパク質であることが明らかであった。

（3）膜内骨化に対する作用

実施例 3 により得られたタンパク質を0.01%ヒト血清アルブミンを含む生理的リン酸緩衝液(pH3.4)に溶解し、 $0.01\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ 、 $0.1\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ および $1\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ 溶液を調製し、その $20\mu\text{l}$ をスプラグドーレー系ラットの左右の頭頂骨のうちその一方の骨膜に生後 1 日目から、マイクロシリンジを用いて一日一回、12日間連日同一部位に注射した。他方の頭頂骨骨膜内には同量のその溶媒を注射した。また、両方の頭頂骨骨膜にその溶媒を注射し、比較対照とした。最終投与一日後に、左右頭頂骨を摘出・固定後、投与部位を横断する脱灰ヘマトキシリン-エオシン染色標本を作成し、左右頭頂骨投与部位の厚さを顕微鏡写真上にて測定し、同一個体における溶媒投与部位の厚さに対する本発明の蛋白質投与部位の厚さの比を算出した。表 3 にその結果を示す。また、図 5 に本発明の蛋白質 $0.1\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ を連続注射した場合の組織切片の光学顕微鏡写真像の一例（図 5 B）を反対側溶媒投与群のそれ（図 5 A）とともに示す。本発明の蛋白質投与により、骨膜細胞（p）の活性化および増殖が認められるとともに、活性化された骨芽細胞（矢印ob）が頭頂骨内および骨膜（p）との境界領域に数多く出現し、用量依存的に頭頂骨（b）の厚さが投与部位において増す事が明らかである。このことは、本発明の蛋白質が、少なくとも局所注入した場合、膜骨化を亢進し、骨粗鬆症、骨折ならびに歯槽、歯根欠損の治療に有用であることが示された。

表 3

本発明の蛋白質の用量 (μg /部位/日)	投与部位の頭頂骨の厚さ(μm)		厚さの比 (B/A)
	溶媒投与(A)	本発明の蛋白質投与(B)	
5	0 (溶媒)	128 \pm 7	1.10 \pm 0.16
	0.01	134 \pm 9	1.27 \pm 0.33
	0.1	119 \pm 19	1.60 \pm 0.10*
	1	132 \pm 9	1.70 \pm 0.14**

頭頂骨の厚さおよびその比の値は、4例の平均値 \pm 標準偏差を示す。

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 対左右頭頂骨溶媒投与群(ウイリアムズ法)

10 (4) 関節軟骨の再生に対する効果

6匹の12週令の雄性家兎(ニュージーランドホワイト)の右側膝部の皮膚および関節包を切開の後、腱を損傷しないように大腿骨の膝蓋骨溝を露出し、その部位に歯科用ドリルを用いて直径5mmの骨髓腔まで貫通した関節軟骨・骨欠損を作成し、その欠損部位に実施例3により得られたタンパク質約10 μg 含有または非含有タイプ-Iコラーゲン凍結乾燥物を実施例4(1)に記載された方法と同様に調製し、3例ずつ埋め込み、関節包および皮膚を縫合し、3週間後に、大腿骨頭を摘出・固定後、全例の脱灰組織切片を作成し、アルシアンブルー染色を行った。図6にそれぞれの典型的一例の光学顕微鏡写真像を示す。タイプ-Iコラーゲン凍結乾燥物のみを埋め込んだ場合(図6Aおよび6B)、欠損部位(矢印d)には線維性の組織(f)を認めるのみであったが、実施例3により得られた本発明のタンパク質約10 μg 含有タイプ-Iコラーゲンを埋め込んだ場合(図6Cおよび6D)、欠損部位に細胞外にアルシアンブルー染色陽性の基質の沈着を伴った、軟骨細胞(ch)の形成を認めた。また、その形成された組織は、正常関節軟骨組織において観察される静止細胞層、増殖細胞層、肥大細胞層といった層状構造に類似の細胞構成構造を欠損部位の外側から内側へと構築していた。これらの所見は、用

いられた家兎のいずれにおいても認められ、本発明のタンパク質が、軟骨の再生、特に、変形性関節症または骨関節炎等により引き起こされた関節軟骨変性組織の正常組織への回復に有効であることを示している。

(5) 骨折・骨欠損に対する治癒効果

5 30匹のスプラグドーレー系雄性ラット（約15週令）を用い、大腿部の皮膚組織を切開、周囲筋肉組織から大腿骨を露出させ、大腿骨骨幹部中央に歯科用ドリルにて5mmの円柱状の骨欠損部を作成、残存大腿骨両端をステンレス製ネジを用いてポリエチレン製のプレートで固定した。実施例3により得られたタンパク質0、約1、10または100 μ g含有タイプ- I コラーゲン凍結乾燥物をその骨欠損部位に埋め込み、皮膚組織を縫合した。埋め込み直後および12週目においてそれらの軟X線写真撮影を行った結果を図7に示す。図7Aは骨欠損作成時の写真である。図7B～Eに示されている如く、タイプ- I コラーゲン単独(図7B)および本研究のタンパク質1 μ g含有タイプ- I コラーゲン(図7C)の埋め込みでは12週目において欠損部両端からの若干の仮骨(矢印cs)の形成を認めたのみであり、骨癒合には至らなかった。一方、10または100 μ g含有タイプ- I コラーゲン(図Dおよび図E)の埋め込みではその骨欠損部位全体に亘って仮骨(矢印cs)の形成を認め、X線上で骨癒合を認めた。12週目において大腿骨を摘出、ポリエチレン製プレートをはずし、
10 二重X線吸収法(Aloka, DCS-600)により1mm間隔のスキャンニングモードで骨欠損作成部を含む大腿骨長軸方向15mmを連続的にその方向に対して垂直に走査し、作成骨欠損中央部3mm相当部位における骨塩量を積算するとともに両骨端を樹脂で固定し、骨強度測定装置(マルト一製作所、MZ-500D)に装着し、180°/分のスピードで下部樹脂で回転させ、大
15 腿骨を破壊するのに必要な最大ねじり力を測定した(表4)。本発明のタンパク質のラット大腿骨欠損部位への埋め込みはこのように、用量依存的にその部位での骨塩量を増加させるとともに、その部位の骨強度
20
25

(ねじり力)を上昇させることが示され、本発明のタンパク質が、骨折の治療および骨欠損部における骨再建に有効であることを示している。

表 4

本発明の蛋白質の 用量(μg / 部位)	ラット大腿骨骨欠損部 における骨塩量 (mg)	最大ねじり力 (kgf · cm)	例数
コラーゲン単独	120.2 ± 24.5	2.92 ± 0.09	6
1	176.9 ± 36.4	6.24 ± 1.00	8
10	277.4 ± 63.9	9.35 ± 3.14	8
100	374.8 ± 67.1*	40.34 ± 7.64*	8

平均値 ± 準誤差を示す。

* $p < 0.05$ 対コラーゲン単独群 (Students' s t-test)

産業上の利用可能性

配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有するタンパク質の二量体からなるタンパク質は軟骨・骨誘導活性を有し、軟骨、骨疾患の治療剤として有用である。さらに本発明のタンパク質の発現ベクターを改変することにより大腸菌を用いた遺伝子工学の手法により工業的な規模で純粹な形で該タンパク質を製造することが可能である。

20

25

配列表

配列番号：1

配列の長さ：119

配列の型：アミノ酸

5 トポロジー：直線状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

起源：

生物名：ヒト (*homo sapiens*)

10 組織の種類：ヒト胎児

配列の特徴：

存在位置：

他の情報：MP52アミノ酸配列の383番目から501番目のアミノ酸配列。

配列：

15	CCA CTG GCC ACT CGC CAG GGC AAG CGA CCC AGC AAG AAC CTT AAG GCT	48
	Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala	
	5	10
	15	
	CGC TGC AGT CGG AAG GCA CTG CAT GTC AAC TTC AAG GAC ATG GGC TGG	96
	Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp	
	20	25
	30	
20	GAC GAC TGG ATC ATC GCA CCC CTT GAG TAC GAG GCT TTC CAC TGC GAG	144
	Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu	
	35	40
	45	
	GGG CTG TGC GAG TTC CCA TTG CGC TCC CAC CTG GAG CCC ACG AAT CAT	192
	Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His	
	50	55
	60	
25	GCA GTC ATC CAG ACC CTG ATG AAC TCC ATG GAC CCC GAG TCC ACA CCA	240
	Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro	
	65	70
	75	80

CCC ACC TGC TGT GTG CCC ACG CGA CTG AGT CCC ATC ACC ATC CTC TTC 288
 Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe
 85 90 95

ATT GAC TCT GCC AAC AAC GTG GTG TAT AAG CAG TAT GAG GAC ATG GTC 336
 Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val
 5 100 105 110

GTG GAG TCG TGT GGC TGC AGG
 Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg 357
 115

配列番号：2

10 配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸

15 起源：なし

生物名：なし

株名：なし

配列の特徴：MP52成熟型単離用順方向PCRプライマー。

配列：

20 ATAATGCCAC TAGCAACTCG TCAGGGC 27

配列番号：3

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

25 トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸

起源：なし

生物名：なし

株名：なし

配列の特徴：MP52成熟型単離用逆方向PCRプライマー。

5 配列：

CGTCGACTAC CTGCAGCCAC ACGACT 26

10

15

20

25

請求の範囲

1. 配列表配列番号1記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
2. 請求項1記載のタンパク質の二量体からなるタンパク質。
3. 請求項2記載のタンパク質を有効成分とする軟骨、骨疾患治療剤。
- 5 4. 軟骨、骨疾患が骨粗鬆症である請求項3記載の軟骨、骨疾患治療剤。
5. 軟骨、骨疾患が変形性関節症または、骨関節炎である請求項3記載の軟骨、骨疾患治療剤。
6. 軟骨、骨疾患が骨折、骨欠損である請求項3記載の軟骨、骨疾患治療剤。
- 10 7. 軟骨、骨疾患が歯根・歯槽の欠損である請求項3記載の軟骨、骨疾患治療剤。
8. 請求項1のタンパク質を発現しうるDNA配列を含むプラスミドで形質転換した大腸菌を用いて請求項1のタンパク質を製造する方法。
- 15 9. 配列表配列番号1記載のアミノ酸配列をコードするDNA配列の5プライム末端にメチオニンをコードするコドンを付加したDNAを含有するプラスミドを構築することを特徴とする請求項8の製造方法。
10. 配列表配列番号1記載のアミノ酸配列をコードするDNA配列の5プライム末端にメチオニンをコードするコドンを付加したDNAを含有するプラスミドを構築し、そのプラスミドで大腸菌を形質転換し、その大腸菌を培養することによって得られるインクルージョンボディを可溶化し、精製することによって得られる単量体のタンパク質を二量体に再生し、これを精製することを特徴とする請求項2のタンパク質の製造方法。
- 20 25 11. 請求項2記載のタンパク質を投与することからなる軟骨、骨疾患の治療方法。
12. 軟骨、骨疾患が骨粗鬆症である請求項11の治療方法。

13. 軟骨、骨疾患が変形性関節症または骨関節炎である請求項11の治療方法。

14. 軟骨、骨疾患が骨折、骨欠損である請求項11の治療方法。

15. 軟骨・骨疾患が歯根、歯槽の欠損である請求項11の治療方法。

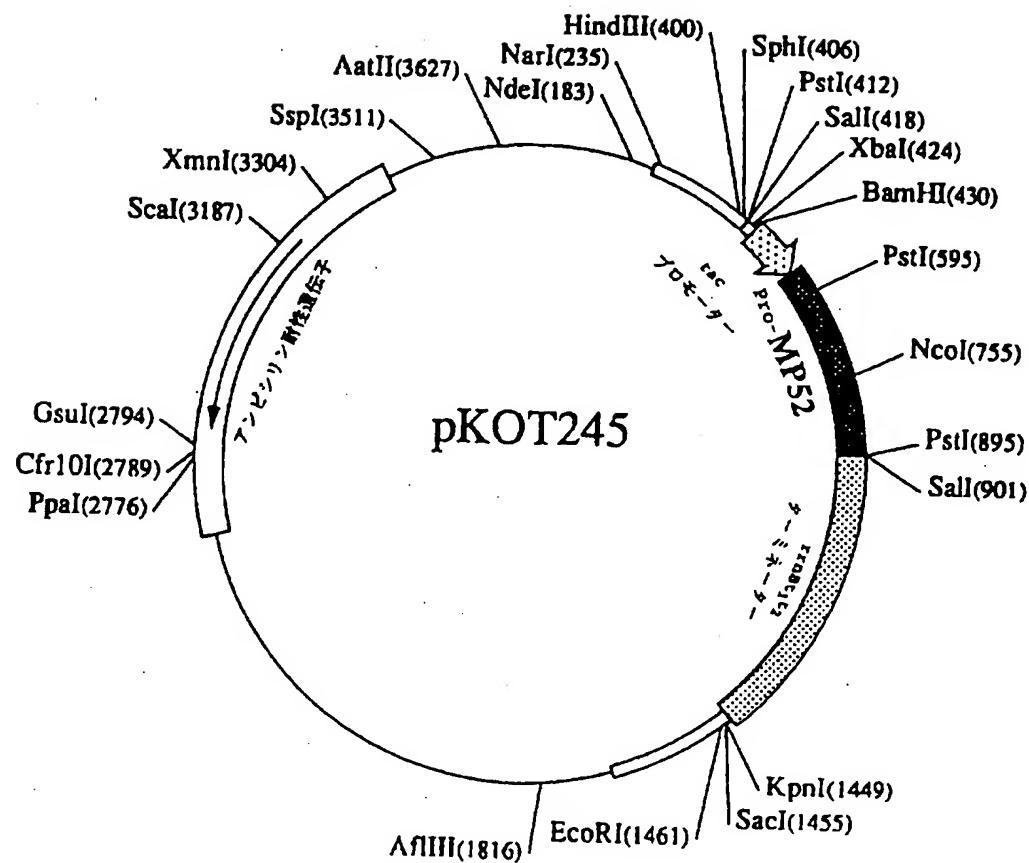
5

10

15

20

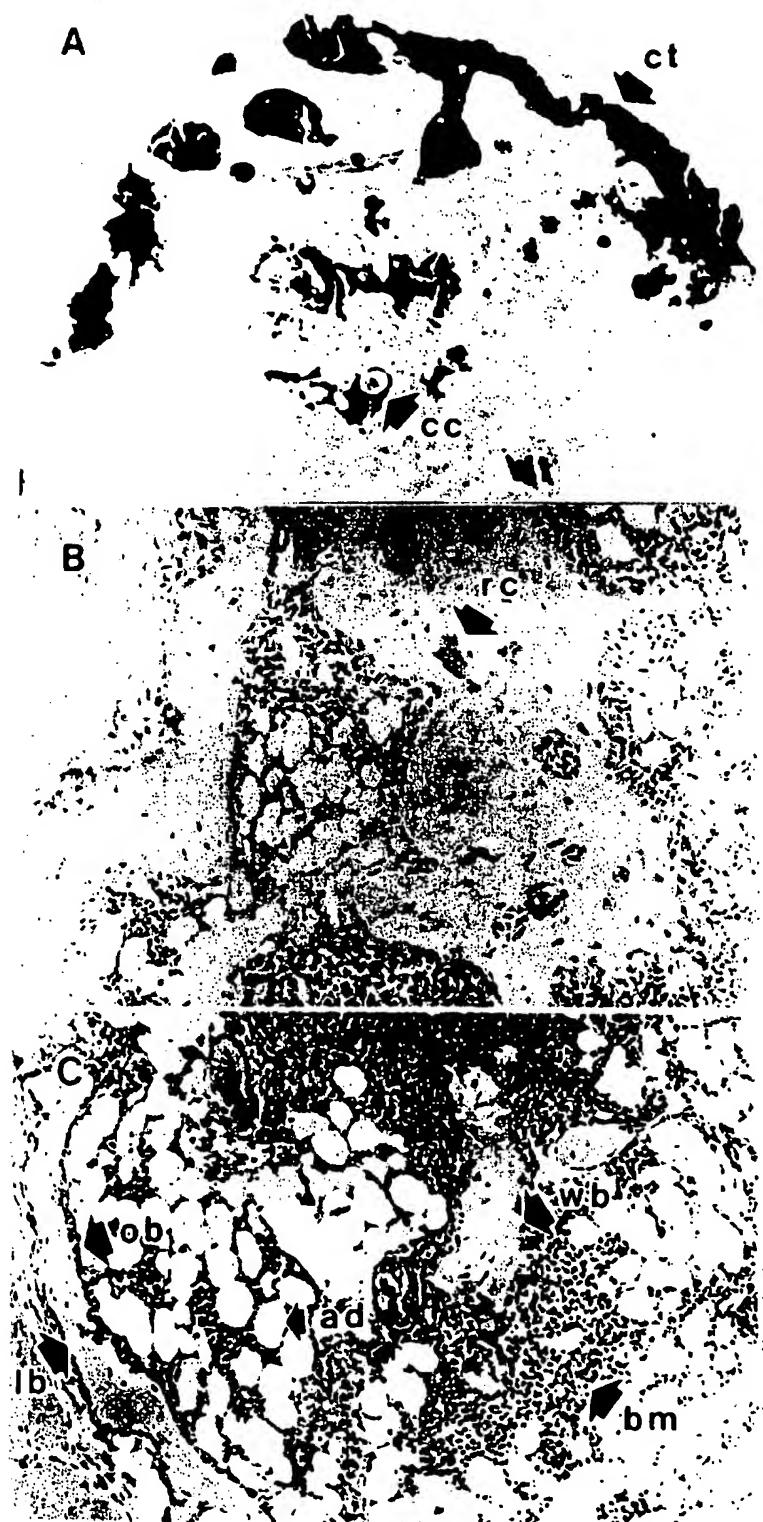
25



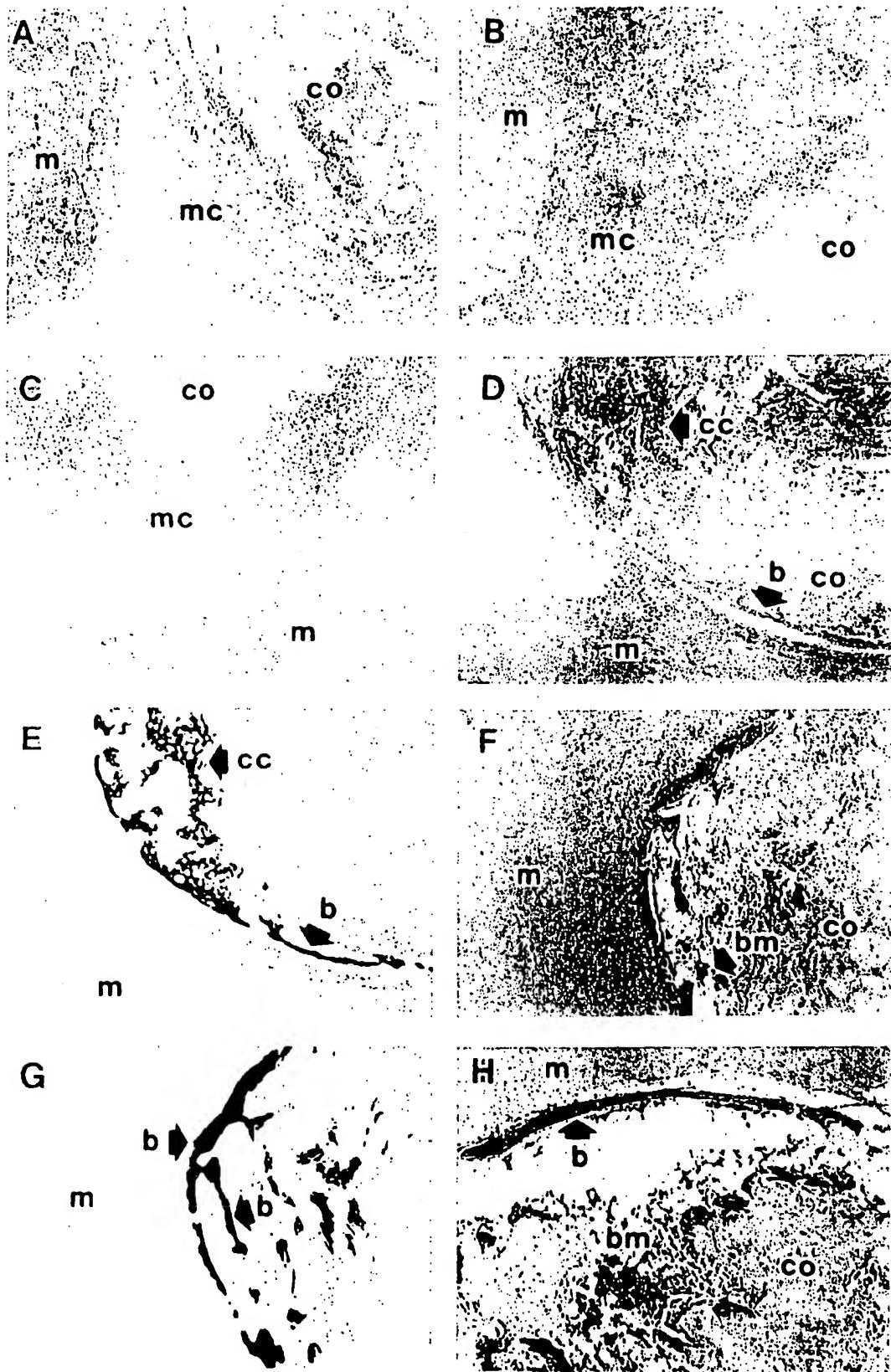
第 1 図



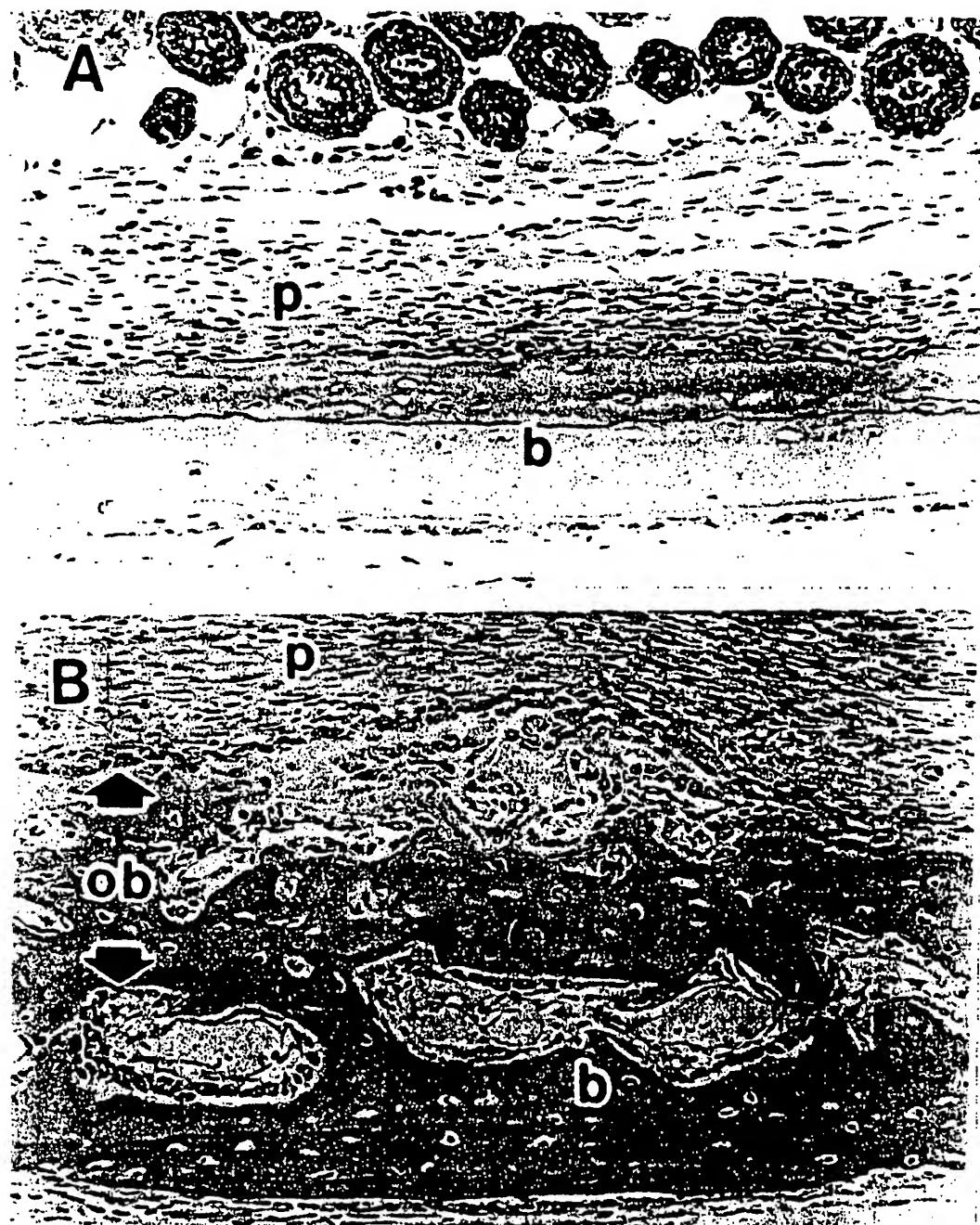
第 2 図



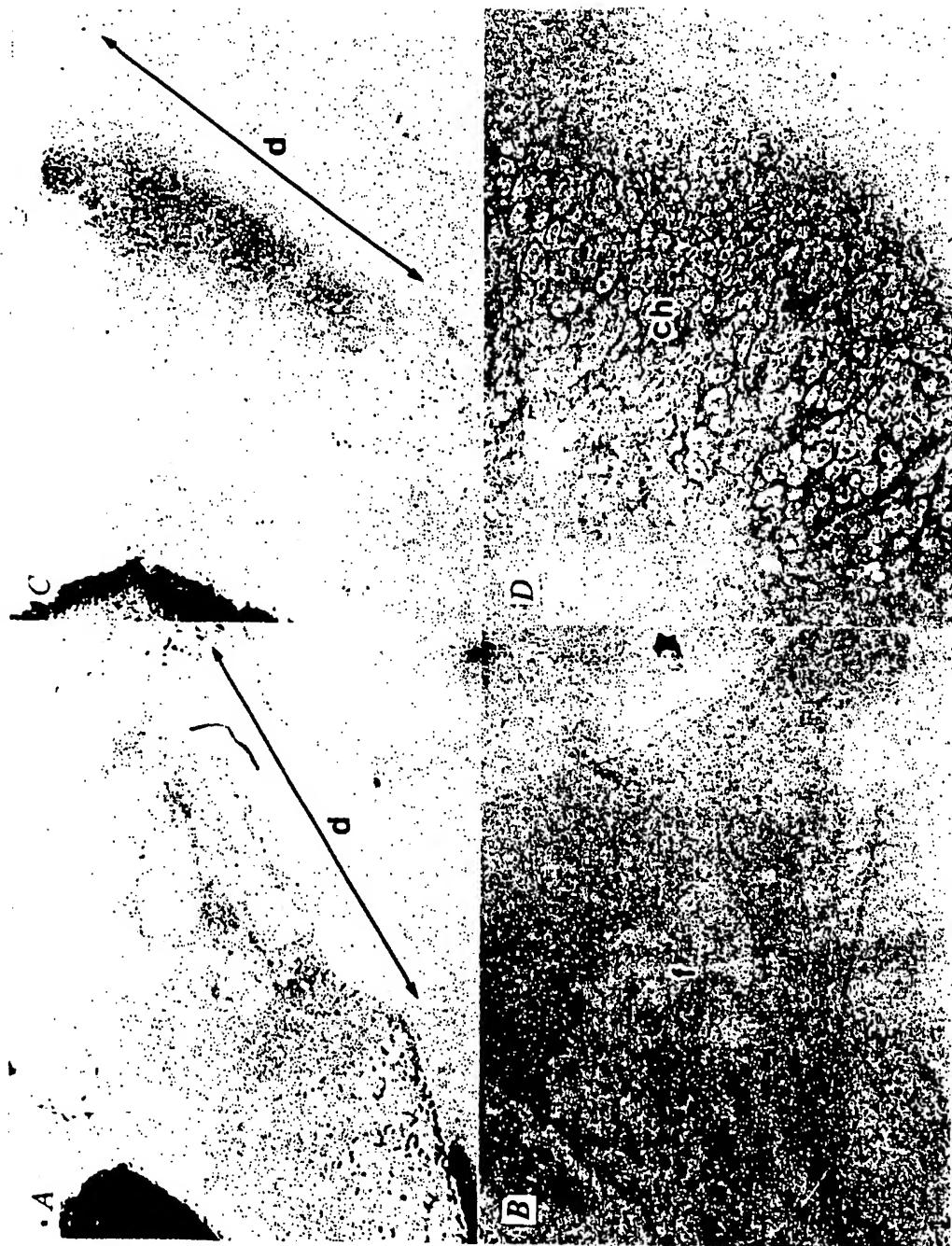
第 3 図



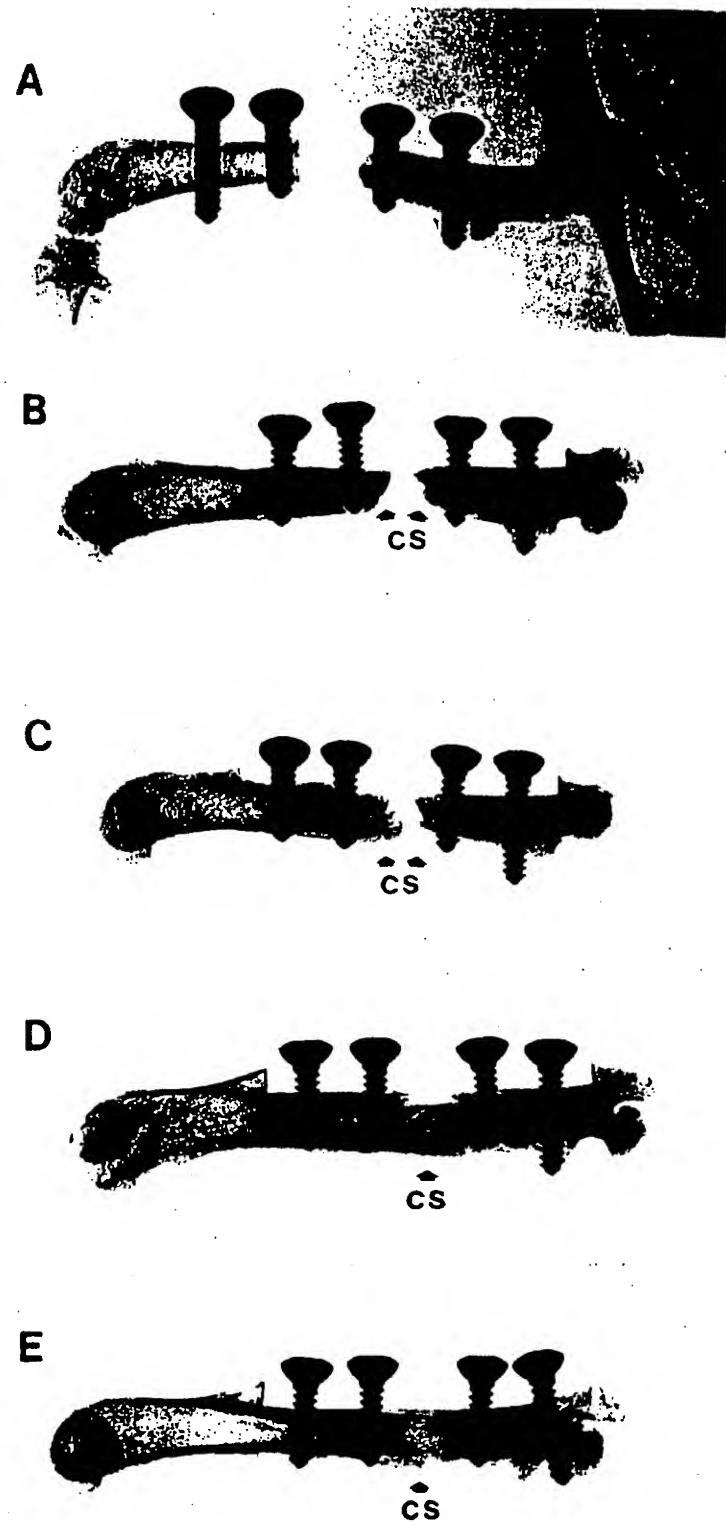
第 4 図



第 5 図



第 6 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C16 C07K14/51, C12N15/12, A61K38/17, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C16 C07K14/00, C12N15/00, A61K38/00, C12P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Biochem. Biophys. Res. Commn., Vol. 204, No. 2, (1994), Gertrud Hotten et al. "Cloning and Expression of Recombinant Human Growth/Differentiation Factor 5", P. 646-652	1 - 15
A	WO, 93/16099, A1 (Biopharm Ges. Zur Biotechnologischen Entwicklung Rungfond Farumaka mbH.), August 19, 1993 (19. 08. 93) & EP, 625989, A1	1 - 15

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

July 4, 1996 (04. 07. 96)

Date of mailing of the international search report

July 16, 1996 (16. 07. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/01062

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

C07K14/51, C12N15/12, A61K38/17, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

C07K14/00, C12N15/00, A61K38/00, C12P21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, Biosis previews

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Biochem. Biophys. Res. Commn., 第204巻, 第2号, (1994). Gertrud Hotten et al 「Cloning and Expression of Recombinant Human Growth/Differentiation Factor 5」, P. 646-652	1-15
A	WO, 93/16099, A1 (ビオファルム ゲゼルシャフト ツア ビオテヒノロギッشن エントヴィック ルング フォン ファル マカ ミット ベシュレ ンクテル ハツツング) 19.8月, 1993 (19.08.93) & EP, 625989, A1	1-15

 C欄の続きを記載している。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.07.96

国際調査報告の発送日

16.07.96

国際調査機関の名称及び先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

新見 浩一

4B 9162

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.